

Title	Hepatoma-derived Growth Factor Stimulates Cell Growth after Translocation to The Nucleus by Nuclear Localization Signals
Author(s)	貴島, 芳彦
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43755">https://hdl.handle.net/11094/43755</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	貴島芳彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16865号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Hepatoma-derived Growth Factor Stimulates Cell Growth after Translocation to The Nucleus by Nuclear Localization Signals (肝癌由来増殖因子は核移行シグナルにより核に移行し細胞増殖能を発揮する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉崎 和幸  (副査) 教授 松澤 佑次 教授 川瀬 一郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Hepatoma-derived growth factor (HDGF) はHuH7細胞の上清より Swiss3T3に対して増殖活性を持つ因子として分離された。HDGFは、繊維芽細胞、血管内皮細胞、ある種の肝癌細胞に対して増殖促進活性を有する。またHDGFには五つの関連蛋白が発見されており、HDGFを含めこれら6つの蛋白はN末端の約100アミノ酸に高いhomologyを有しており、HDGFファミリーを形成している。我々はこのN末端の約100アミノ酸のhomologyの高い領域をHATH (Homologous Amino Terminus of HDGF) 領域と名付けた。しかし、HATH領域以外のC末端側の遺伝子特異的領域は殆どhomologyを有しない。HDGFのN末端にはシグナルペプチドは存在しない。一方、HDGFのHATH領域内に核移行シグナル様配列NLS1と遺伝子特異的領域に核移行シグナルNLS2が存在する。

そこで、HDGFの核移行能における核移行シグナルの役割、核移行能と細胞増殖活性との関連性、さらに、HDGFにおける細胞増殖活性の発現部位の解析を行った。

#### 【方法】

HDGFのNLS1及びNLS2のmutant、及び、truncated formを作製した。HDGFのNLS1、2両方を欠失させたHDGFdN1dN2、NLS1の塩基性アミノ酸を変異させたHDGFmN1、NLS2の塩基性アミノ酸を変異させたHDGFmN2、NLS1、2両方を変異させたHDGFmN1mN2、N末端よりNLS2までの領域(HDGF-LA)、HDGF-LAよりNLS2を除いた領域(HDGF-SA)、さらに、NLS2を含むC末端までの領域(HDGF-LP)を作製した。更に、HDGFdN1dN2のNLS2に相当する部位にp53のNLSを挿入しHDGFdN1dN2-P53NLSを作製した。細胞内局在はGFPキメラ蛋白を作製し293細胞に強制発現させて解析した。細胞増殖活性は293細胞を用いたtransient expressionの系でのDNA合成能で測定した。更に、HepG2とNIH3T3を用いてmyc-taggedのHDGF、HDGFdN1dN2のstable transformantを作製しDNA合成能と細胞数を測定した。

#### 【成績】

NLS1及び2の存在するintact HDGFは核に移行したが、HDGFmN1mN2、HDGFdN1dN2は核に移行しなかった。また、NLS1のみが存在するHATH領域でも核に移行したが、一部、細胞質に存在していた。HDGFmN1は核

に移行した。HDGFmN2では核に移行したが、一部、細胞質に留まった。以上より、HDGF 蛋白の核移行能には NLS2が主に機能しており、NLS1は補助的に作用していると思われた。

リコンビナント HDGF を細胞に添加すると増殖活性を示す。GFP キメラ蛋白を含む培養液を濃縮した後293細胞に添加すると over expression の系と同様のパターンを示した。すなわち、GFP-HDGF は細胞内へ取り込まれ核へ移行した。GFP-HDGFdN1dN2は、細胞内へ取り込まれたが核には移行しなかった。GFP-HATH 蛋白を添加しても細胞内に取り込まれ、一部核に移行した。尚、HATH 領域を含まない遺伝子特異的領域のみでは細胞内に移行しなかった。以上より、HDGF は HATH 領域を介して細胞内へ取り込まれることが示唆された。

HepG2細胞の myc-HDGF の stable transformant では Mock に比べて細胞数の有意な増加 (1.5~2 倍) と DNA 合成能の上昇 (2 倍) を認めたが、HDGFdN1dN2の stable transformant では細胞数の増加や DNA 合成能の上昇は認められなかった。NIH3T3細胞においても myc-HDGF の stable transformant では DNA 合成能の上昇 (2.5~3 倍) が認められたが、HDGFdN1dN2では認められなかった。GFP-HDGF を強制発現させた293細胞では Mock と比べ DNA 合成能が有意に上昇していたが (2 倍)、HDGFmN1mN2、HDGFdN1dN2を強制発現させた細胞では DNA 合成能の上昇は認められなかった。以上より、HDGF は核に移行することにより細胞増殖活性を示すことが示唆された。

次に、HDGF の増殖活性発現に HDGF 蛋白のどの部位が必要であるかを GFP キメラ蛋白を用いた transient expression の系で検討した。HATH 蛋白には細胞増殖活性は認められなかったが、遺伝子特異的領域のみを強制発現させると HDGF と同程度の増殖活性が得られた。また、NLS2を含む HDGF-LA は HDGF-SA と同様に DNA 合成能の上昇を示さず、更に HDGF-LP でも細胞増殖活性を示さなかった。GFP-HDGFdN1dN2-P53NLS を293細胞に強制発現させると核に移行したが、細胞増殖活性は得られなかった。以上より、HDGF の細胞増殖活性発現には NLS2が必須であるとともに NLS2の両側の隣接領域も必要であると思われた。

#### 【総括】

HDGF は HATH 領域を介して細胞内に取り込まれ、主として NLS2により核に移行すると考えられた。HDGF の細胞増殖活性発現には核移行が必須であると思われた。

HDGF の細胞増殖活性は遺伝子特異的領域に存在し、特に、細胞増殖活性発現には遺伝子特異的領域の NLS2とその両側の隣接領域が重要であると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

この研究は Hepatoma-derived Growth Factor (HDGF) の細胞増殖の発現機構について検討したものである。すなわち、HDGF の核移行シグナル (NLS) の存在に着目し核移行能と細胞増殖能の関連を検討し、細胞増殖活性の発現部位を解析している。HDGF の NLS mutants 及び truncated forms を作製し、これらの GFP fusion 蛋白を293細胞に強制発現させて遺伝子特異的領域の核移行シグナル (NLS) により、核に移行することを明らかにした。更に、遺伝子特異的領域の NLS とその隣接部位が細胞増殖活性発現に必須であることを明らかにした。細胞外からの添加にて、HDGF は HATH (Homologous to the Amino Terminus of HDGF) 領域を介して細胞内に取り込まれることも示している。これらのことは HDGF に特徴的な細胞増殖発現機構を示したものである。

以上より、この研究は学位に値するものとする。